

BUNDEREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

E203/06565 #2

REC'D 14 AUG 2003

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 37 082.6

Anmeldetag:

09. August 2002

Anmelder/Inhaber:

Sartorius AG, Göttingen/DE

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtung zur biotechnologischen
Herstellung von Wertstoffen

IPC:

C 12 P, C 12Q, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Anmelder: Sartorius AG
Anwaltsakte: P-SAR 19

5 **Verfahren und Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen**

Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen, bei dem einem Bioreaktor ein Medium zugefüttert und einem Fermentationsprozess unterzogen wird, und bei dem über eine nachgeschaltete Querstromfiltrationsanlage der Wertstoff als gefiltertes Permeat und / oder
15 als konzentriertes Retentat geerntet wird und Rückstände dem Bioreaktor bis zur Ernte als Retentat wieder zugeführt werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen, im Wesentlichen bestehend aus einem Bioreaktor mit einem vorgeschalteten ersten Zufütterbehälter für ein Medium und einer nachgelagerten Querstromfiltrationsanlage, deren Permeatleitung mit einem ersten Erntebehälter verbunden ist und deren Retentatleitung in den Bioreaktor zurückführt.

Ein Verfahren zur biotechnischen Herstellung von Wertstoffen ist beispielsweise aus der EP 0 307 737 B1 bekannt. Insbesondere für die Herstellung rekombinanter Proteine ergibt sich
30 jedoch ein Widerspruch zwischen einer möglichst hohen Zellproduktivität (Hochzellldichtekultivierung) und einer langen Standzeit der Membranen (Cross-Flow-Membranen) von Querstrommikrofiltrationsanlagen. Insbesondere kann es bei einer Erhöhung des Permeatfluxes über einen bestimmten Grenzwert bei
35 gegebener Biomassekonzentration in der Produktlösung zu einem dramatischen Anstieg des Transmembrandruckes und damit zu ei-

nem Zusetzen der Membranporen, zu einem sogenannten Membran-fouling, kommen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, den Fermentierungs- und Filtrationsprozess so zu verbessern, dass bei
5 möglichst hoher Zellproduktivität eine möglichst lange Standzeit der Membranen der Querstromfiltrationsanlage erreicht werden kann.

10 Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruchs 1 dadurch gelöst, dass neben dem Medium weitere Stoffe dem Bioreaktor kontrolliert zugefüttert werden können, dass das konzentrierte Retentat und das Permeat kontrolliert
15 geerntet werden können und dass über eine Kontrolleinheit der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander abgestimmt geregelt werden.

Dadurch, dass der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander abgestimmt geregelt
20 werden, so dass insbesondere die Zufütterung von Stoffen und die Ernte kontrolliert erfolgen kann, wird zuverlässig erreicht, dass kritische Werte, die die Standzeit der Membranen verringern könnten, vermieden werden. Insbesondere ist es so
möglich, den Überströmdruck durch den die Produktionslösung, die die Wertstoffe enthält, an der Membran vorbeigeführt
25 wird, größer zu halten als den Transmembrandruck quer zur Membran, wodurch sich die Standzeit der Membran erhöht.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann
30 das integrierte System von der digitalen Kontrolleinheit gesteuert einer in-situ-Reinigung und Sterilisation unterzogen werden. Dadurch wird eine schnelle und sichere Reinigung und Sterilisation ermöglicht.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als Wertstoffe rekombinante Proteine hergestellt, wobei das Permeat eine zellfreie Ernte und das Retentat eine zellbehaftete Ernte ergibt. Der Prozessablauf kann dabei im Rahmen einer sequentiellen integrierten Prozessführung erfolgen. In einer Batchphase können dabei dem Bioreaktor zugeführte Zellen an das Medium adaptieren und in einer anschließenden Fed Batchphase die Zellen durch Zufütterung mit konstanter Wachstumsrate angezogen werden. In einer anschließenden Produktionsphase erfolgt durch Zugabe eines Induktionsstoffes die Induktion der Produktbildung und die eigentliche Herstellung der rekombinanten Proteine. Die Konzentration des Induktionsstoffes kann dabei vorteilhaft über eine Fließdiffusionsanalyse gemessen und über Zufütterung aus einer Vorlage geregelt werden. In einer an die Produktionsphase anschließenden Produkterntephase wird dann ein Teil des Bioreaktors zellfrei abgeerntet. Die Zellmasse des Retentats wird in einer Zellerntephase abgeerntet, der sich eine Mediumrefreshphase mit einer Zufütterung anschließen kann. Nach der Mediumrefreshphase beginnt der eigentliche zyklische Prozess, bei dem außer in der Produkternte nur der Retentat- aber nicht der Permeatstrom fließen soll, mit der Produktionsphase neu.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die rekombinanten Proteine unter Verwendung der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt. Die Hefe ist ähnlich leicht zu kultivieren wie *E.coli*, sie ist aber als Eukaryot viel besser für eine korrekte Faltung der rekombinanten Proteine geeignet. Weiterhin ist sie fähig, Proteine zu glycolysieren, was wichtig für deren strukturelle Vollständigkeit, Löslichkeit und biologische Aktivität ist. Darüber hinaus können Hefenproteine über die Zellwand ausscheiden (Sekretion) damit die Trennung der gewünschten Produkte von zellulären Bestandteilen stark erleichtern.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird zur Induktion der Sequenzen des Zellproteins als Induktionsstoff Methanol in das Medium des Bioreaktors zugegeben. Dabei wird die Methanolkonzentration auf einem konstanten Level gehalten.

Da die Sequenzen des Zielproteins in den nativen Genabschnitt zur Expression einer Alkoholoxidase (AOX) von *P. pastoris* integriert werden, erfolgt durch eine Zugabe von Methanol in das Medium deren Induktion.

Dadurch, dass die Methanolkonzentration auf einem möglichst konstanten Level im unteren Gramm / Liter-Bereich gehalten wird, wird eine Überfütterung, die toxisch wirken könnte, vermieden. Durch eine Online-Messung und Regelung der Methanolkonzentration über die erwähnte Fließdiffusionsanalyse wird der konstante Level der Methanolkonzentration ermöglicht.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird in der Fed Batchphase und / oder in der Produktionsphase zur Produktionssteigerung Glycerol zugefüttert.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verläuft der Prozessablauf im Rahmen einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung. Dabei laufen die Produktionsphase, die Produkterntephase und die Zellerntephase parallel ab. Damit wird eine permanente Produkt- und Turbidostat-zellernte, letztere zur Aufrechterhaltung der Membranfunktionalität, ermöglicht.

Da für *P. pastoris* geeignete sekretorische Gensequenzen zur Verfügung stehen, können die gewünschten Produkte mittels integrierten Bioprozess hergestellt werden. Dabei können sowohl prozessvorbereitende Schritte (up stream), beginnend mit der

Konstruktion produktionsgeeigneter Expressionssysteme bis hin zur Vorkulturführung, als auch nachfolgender Primäraufbearbeitungsschritte (down stream) in die eigentlich Reaktionsführung, d.h. Zellkultivierung und Produktbildung, eingebunden werden. Durch diese Prozessführung werden die umweltbelastenden Aufbearbeitungsschritte einer Proteinprozessierung mit E.coli vermieden. Die Produkternte während des Kultivierungsablaufes kann hier direkt in nachfolgenden Feinreinigungsschritten für die korrekt prozessierten Proteine überführt werden.

Die beispielsweise aus der EP 0 307 737 B1 bekannte Vorrichtung weist die für die bekannten Verfahren beschriebenen Nachteile auf.

Weitere Aufgabe der Erfindung ist es daher, die bekannten Vorrichtungen so zu verbessern, dass der bei der Herstellung rekombinanten Proteine bekannte Widerspruch einer möglichst hohen Zellproduktivität und einer langen Standzeit der Membranen gelöst wird.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 17 dadurch gelöst, dass mindestens ein zweiter Zufütterbehälter mit einem Induktionsstoff dem Bioreaktor vorgeschaltet ist, dass ein zweiter Erntebehälter für eine zellbehaftete Ernte des Retentats über eine Ernteleitung mit dem Bioreaktor verbunden ist und dass eine Kontrolleinheit zur Messung und Regelung des Fermentations- und Filtrationsprozesses angeordnet ist.

Durch die (digitale) Kontrolleinheit zur Messung und Regelung des Fermentations- und Filtrationsprozesses wird ein optimaler Prozessverlauf erzielt, der bei einer hohen Zellproduktivität eine lange Standzeit der Membranen ermöglicht.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist zur Messung der Konzentration des Induktionsstoffes im Bioreaktor die Kontrolleinheit ein Analysesystem auf, das über einen im Bioreaktor angeordneten Sensor die Konzentration des Induktionsstoffes misst und durch Steuerung einer dem zweiten Zufütterbehälter vorgeschalteten Fütterpumpe die Induktionsstoffkonzentration im Bioreaktor regelt. Insbesondere bei einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung ist das Analysesystem dabei als ein Fließdiffusionsanalysesystem ausgebildet. Dadurch wird vorteilhaft eine kontinuierliche Messung und Regelung ermöglicht.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist zur Messung einer Zellkonzentration im Bioreaktor die Kontrolleinheit ein zweites Analysesystem auf, das über einen im Bioreaktor angeordneten zweiten Sensor die Zellkonzentration misst und durch Steuerung einer dem zweiten Erntebehälter vorgeschalteten Erntepumpe die Zellkonzentration im Bioreaktor regelt.

Die Kontrolleinheit kann sämtliche regeltechnischen Aufgaben, die typisch für einen Fermentationsprozess sind, übernehmen, beispielsweise Messung und Regelung von Temperatur, pH-Wert, pO_2 -Wert über Begasungsrate und Gaszusammensetzung, Rührerdrehzahl, Schaumbekämpfung u.s.w.. Die Kontrolleinheit übernimmt auch die Regelung der Parameter der automatisierten Querstromfiltrationsanlage, wie Permeatstrom, Retentatstrom und die automatische in-situ-Reinigung und Sterilisation des integrierten Systems.

Als Querstromfiltrationsanlagen kommen Mikrofiltrations- und Ultrafiltrationsanlagen oder Kombinationen aus Mikro- und Ultrafiltrationsanlagen in Frage.

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beispielsweise veranschaulicht sind.

5

In den Zeichnungen zeigen:

Figur 1: eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen,

10

Figur 2: einen Prozessablauf einer sequenziell integrier-
ten Prozessführung, bei dem das Reaktorvolumen V_L
und die Zellkonzentration c_{x1} (Biotrockenmasse)
in Abhängigkeit von der Zeit t aufgetragen sind
und

15

Figur 3: eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstel-
lung von Wertstoffen mit einem ersten und zweiten
Analysesystem einer nicht weiter dargestellten
digitalen Kontrolleinheit.

20

Eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wert-
stoffen besteht im Wesentlichen aus einem Bioreaktor 1 mit
einem vorgeschalteten ersten Zufütterbehälter 2, einem zwei-
ten Zufütterbehälter 3, einem dritten Zufütterbehälter 4 und
einer nachgelagerten Querstromfiltrationsanlage 5, sowie ei-
ner Kontrolleinheit 6.

25

Der erste Zufütterbehälter 2 ist über eine erste Zufütterlei-
tung 7 und eine erste Zufütterpumpe 8 mit dem Bioreaktor 1
verbunden. Der zweite Zufütterbehälter 3 ist über eine zweite
Zufütterleitung 9 und eine zweite Zufütterpumpe 10 mit dem
Bioreaktor 1 verbunden. Der dritte Zufütterbehälter 4 ist ü-

30

ber eine dritte Zufütterleitung 11 und eine dritte Zufütterpumpe 12 ebenfalls mit dem Bioreaktor 1 verbunden.

Die Querstromfiltrationsanlage 5 ist dem Bioreaktor 1 nachgelagert und über eine Förderleitung 13 mit dem Bioreaktor 1 verbunden. Zwischen Bioreaktor 1 und Querstromfiltrationsanlage 5 ist eine Förderpumpe 14 angeordnet. Über eine Permeatleitung 15 und eine Permeatpumpe 25 ist die Querstromfiltrationsanlage 5 mit einem ersten Erntebehälter 16 verbunden.

Die Querstromfiltrationsanlage 5 ist über eine Retentatleitung 17 mit dem Bioreaktor 1 verbunden. Ein zweiter Erntebehälter 18 ist für eine zellbehaftete Ernte des Retentats über eine Ernteleitung 19 und eine Harvestpumpe 20 mit dem Bioreaktor 1 verbunden.

Die digitale Kontrolleinheit 6 ist über Messleitungen 21 mit den Behältern 2, 3, 4, 16, 18 zugeordneten Wägevorrichtungen 22 verbunden. Über Steuerleitungen 23 ist die Kontrolleinheit 6 mit den Pumpen 8, 10, 12, 14, 20 verbunden.

In Figur 2 ist der Prozessablauf einer sequenziell integrierten Prozessführung für die Herstellung rekombinanter Proteine unter Einsatz der Hefe *P. pastoris* dargestellt. Aufgetragen sind das Reaktorvolumen V_L des Bioreaktors 1 und die Zellkonzentration c_{x1} (Biotrockenmasse). In einer Batchphase 29 $t \in [0, t_1]$ adaptieren die Zellen an das Medium und werden bis ca. 15 gl^{-1} angezüchtet. Das Reaktorvolumen V_L nimmt durch Probenahme ab.

In einer Fed Batchphase 30 $t \in [t_1, t_2]$ werden die Zellen durch Zufütterung von Glycerol 37 bis 25 gl^{-1} mit konstanter (substratlimitierter) Wachstumsrate angezogen.

In der Produktionsphase 31 $t \in [t_2, t_3]$ erfolgt durch Zugabe von Methanol 36 als Induktionsstoff zunächst die Induktion

der Produktbildung und die eigentliche Herstellung der rekombinanten Proteine.

Die Methanolkonzentration wird mit einem Analysesystem 24 der
 5 Kontrolleinheit 6, das als Fließdiffusionsanalyse-System
 (FDA) ausgebildet ist, gemessen und über Zufütterung aus dem
 zweiten Zufütterbehälter 3 - der Methanolvorlage - durch
 Steuerung der zweiten Zufütterpumpe 10 geregelt.

10 Zur Produktionssteigerung kann in dieser Phase eine geringe
 Menge Glycerol 37 aus dem dritten Zufütterbehälter 4 durch
 Steuerung der dritten Zufütterpumpe 12 über die dritte Zufüt-
 terleitung 11 dem Bioreaktor 1 zugegeben werden. Durch Zugabe
 von Medium 35 aus dem ersten Zufütterbehälter 2 über die ers-
 15 te Zufütterleitung 7 in den Bioreaktor 1 steigt das Reaktor-
 volumen V_L an und die Zellen wachsen vermindert weiter (im
 Beispiel bis 30 gl^{-1}). In der Produkterntephase $32 \text{ t} \in [t_3, t_4]$
 wird ein Viertel (Menge ist in Grenzen wahlfrei) des Bio-
 reaktors 1 zellfrei als Permeat der Querstromfiltrationsanla-
 20 ge 5 abgeerntet. Das Permeat 38 fließt dabei über die Per-
 meatpumpe 25 und die Permeatleitung 15 in den ersten Erntebe-
 hälter 16. Dadurch steigt die Zellkonzentration bis 40 gl^{-1}
 an.

25 Ab t_6 wird wieder mit dem gleichen Produktions- und Erntezyk-
 lus wie bei t_2 mit ca. 25 gl^{-1} gestartet. In einer Zellernte-
 phase $33 \text{ t} \in [t_4, t_5]$ wird über die Harvestpumpe 20 und die
 Ernteleitung 19 Zellmasse bzw. Retentat aus dem Bioreaktor 1
 in den zweiten Erntebehälter 18 abgelassen. In einer Medium-
 30 refreshphase $34 \text{ t} \in [t_5, t_6]$ wird methanol- und glycerolfrei-
 es Medium 35 aus dem ersten Zufütterbehälter 2 dem Bioreaktor
 1 zugegeben.

Ab t_6 beginnt der eigentliche zyklische Prozess, bei dem außer in der Produkternte 32 nur der Retentat- aber nicht der Permeatstrom fließen soll.

- 5 Die hier angegebenen Daten für Zeiten, Prozente u.s.w. sind nur für den untersuchten Prozess gültig. Sie können stark variieren. Eine Ausdehnung auf Zellkulturen ist möglich.

10 Bei einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung laufen die drei Phasen 31, 32, 33 des Produktions- und Erntezyklus $t \in [t_2, t_6]$ parallel ab. Hierbei handelt es sich um ein vermaschtes Regelungsproblem, das über die digitale Kontrolleinheit 6 gemessen und geregelt wird.

- 15 In Figur 3 ist eine Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen mit einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung dargestellt. Hierzu weist die in Figur 3 nicht weiter dargestellte Kontrolleinheit 6 ein Analysesystem 24 auf, das über einen im Bioreaktor 1 angeordneten Sensor 26 die Konzentration des Induktionsstoffes, im Beispiel die Methanolkonzentration, misst und durch Steuerung der dem zweiten Zufütterbehälter 3 vorgeschalteten Zufütterpumpe 10 die Induktionsstoff- bzw. Methanolkonzentration im Bioreaktor 1 geregelt. Das Analysesystem 24 ist dabei als ein Fließdiffusionsanalyse-System (FDA) ausgebildet. Über die Fließdiffusionsanalyse wird der Istwert der Methanolkonzentration ge-
25 messen und einem ersten Regler 39 zugeführt, der den Istwert mit dem Sollwert eines ersten Sollwertstellers 40 vergleicht und ein Steuersignal an die zweite Zufütterpumpe 10 gibt.

30

- Zur Messung der Zellkonzentration im Bioreaktor 1 weist die Kontrolleinheit 5 ein zweites Analysesystem 27 auf. Das zweite Analysesystem 27 misst über einen im Bioreaktor 1 angeordneten zweiten Sensor 28 die Zellkonzentration und regelt
35 durch Steuerung einer dem zweiten Erntebehälter 18 vorge-

schalteten Harvestpumpe 20 (Erntepumpe) die Zellkonzentration im Bioreaktor 1. Über einen mit dem zweiten Sensor 28 verbundenen Analysator 41 wird der Istwert der Zellkonzentration analysiert bzw. gemessen und einem zweiten Regler 42 zugeführt, der den Istwert mit dem Sollwert eines zweiten Sollwertstellers 43 vergleicht und ein Steuersignal an die Harvestpumpe 20 gibt.

Zur Regelung der Mediumzugabe in den Bioreaktor 1 erhält ein dritter Regler 44 von der Wägevorrichtung 22 des Bioreaktors 1 ein Istsignal und vergleicht das Istsignal bzw. den Istwert mit dem Sollwert eines dritten Sollwertstellers 45 und gibt ein entsprechendes Steuersignal an die erste Zufütterpumpe 8.

Anmelder: Sartorius AG
Anwaltsakte: P-SAR 19

5 Patentansprüche

1. Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen bei dem einem Bioreaktor ein Medium zugefüttert und
10 einem Fermentationsprozess unterzogen wird und bei dem über eine nachgeschaltete Querstromfiltrationsanlage der Wertstoff als gefiltertes Permeat und / oder als konzentriertes Retentat geerntet wird und Rückstände dem Bioreaktor bis zur Ernte als Retentat wieder zugeführt werden, **dadurch gekennzeichnet**,
15 dass neben dem Medium weitere Stoffe dem Bioreaktor (1) kontrolliert zugefüttert werden können, dass das konzentrierte Retentat und das Permeat kontrolliert geerntet werden können, und dass über eine Kontrolleinheit (6) der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander
20 abgestimmt geregelt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das integrierte System von der Kontrolleinheit (6) gesteuert einer in-situ-Reinigung und Sterilisation unterzogen werden kann.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Wertstoffe rekombinante Proteine hergestellt werden, wobei das Permeat eine zellfreie Ernte und das Retentat eine
30 zellbehaftete Ernte ergibt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Prozessablauf im Rahmen einer sequentiellen integrierten Prozessführung erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Batchphase (29) dem Bioreaktor (1) zugeführte Zellen an das Medium adaptieren und in einer anschließenden Fed Batchphase (30) die Zellen durch Zufütterung mit konstanter Wachstumsrate angezogen werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Produktionsphase (31) durch Zugabe eines Induktionsstoffes die Induktion der Produktbildung und die eigentliche Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Konzentration des Induktionsstoffes über eine Fließdiffusionsanalyse gemessen und über Zufütterung aus einem zweiten Zufütterbehälter (3) geregelt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Produkterntephase (32) ein Teil des Bioreaktors (1) zellfrei abgeerntet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass in einer Zellerntephase (33) Zellmasse des Retentats abgeerntet und eine Mediumrefreshphase (34) mit einer Zufütterung von Medium (35) angeschlossen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach der Mediumrefreshphase (34) der zyklische Prozess, bei dem außer in der Produkternte nur der Retentat- aber nicht der Permeatstrom fließen soll, mit der Produktionsphase (31) neu beginnt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die rekombinanten Proteine unter Verwendung der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Induktion der Sequenzen des Zellproteins als Induktionsstoff Methanol (36) in das Medium (35) des Bioreaktors (1) zugegeben wird.

5

13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Methanolkonzentration auf einem konstanten Level gehalten wird.

10 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der Fed Batchphase (30) und / oder in der Produktionsphase (31) zur Produktionssteigerung Glycerol (37) zugefüttert wird.

15 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Prozessablauf im Rahmen einer kontinuierlichen integrierten Prozessführung verläuft.

20 16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Produktionsphase (31), die Produkterntephase (32) und die Zellerntephase (33) parallel ablaufen.

25 17. Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen im Wesentlichen bestehend aus einem Bioreaktor mit einem vorgeschalteten ersten Zufütterbehälter für ein Medium und einer nachgelagerten Querstromfiltrationsanlage, deren Permeatleitung mit einem ersten Erntebehälter verbunden ist und deren Retentatleitung in den Bioreaktor zurückführt, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein zweiter Zufütterbe-
30 hälter (3) mit einem Induktionsstoff dem Bioreaktor (1) vorgeschaltet ist, dass ein zweiter Erntebehälter (18) für eine zellbehaftete Ernte des Retentats über eine Ernteleitung (19) mit dem Bioreaktor (1) verbunden ist, und dass eine Kontrolleinheit (6) zur Messung und Regelung des Fermentations-
35 und Filtrationsprozesses angeordnet ist.

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**,
dass zur Messung der Konzentration des Induktionsstoffes im
Bioreaktor (1) die Kontrolleinheit (6) ein Analysesystem (24)
aufweist, das über einen im Bioreaktor (1) angeordneten Sen-
5 sor die Konzentration des Induktionsstoffes misst und durch
Steuerung einer dem zweiten Zufütterbehälter (3) vorgeschal-
teten zweiten Zufütterpumpe (9) die Induktionsstoffkonzentra-
tion im Bioreaktor (1) regelt.

10 19. Vorrichtung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**,
dass das Analysesystem (24) als ein Fließdiffusionsanalyse-
System (FDA) ausgebildet ist.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 18, **dadurch**
15 **gekennzeichnet**, dass zur Messung einer Zellkonzentration im
Bioreaktor (1) die Kontrolleinheit (6) ein zweites Analyse-
system (27) aufweist, das über einen im Bioreaktor (1) ange-
ordneten zweiten Sensor (28) die Zellkonzentration misst und
durch Steuerung einer dem zweiten Erntebehälter (18) vorge-
20 schalteten Harvestpumpe (20) die Zellkonzentration im Biore-
aktor (1) regelt.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 20, **dadurch**
gekennzeichnet, dass zur Regelung der Mediumzugabe in den
25 Bioreaktor (1) ein dritter Regler (44) über eine Wägevorrich-
tung (22) des Bioreaktors (1) mit einer Zufütterpumpe (8)
verbunden ist.

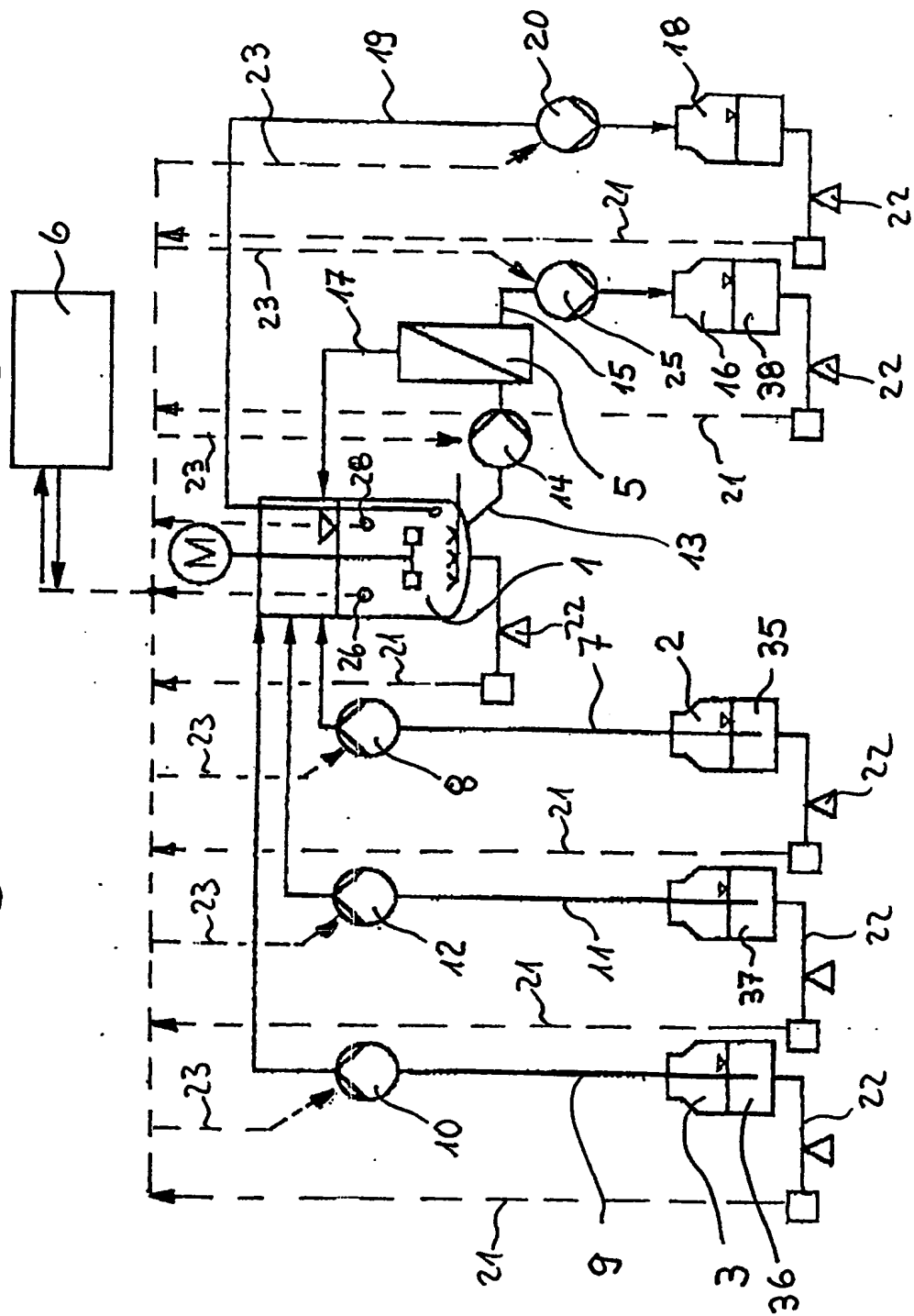


Fig. 1

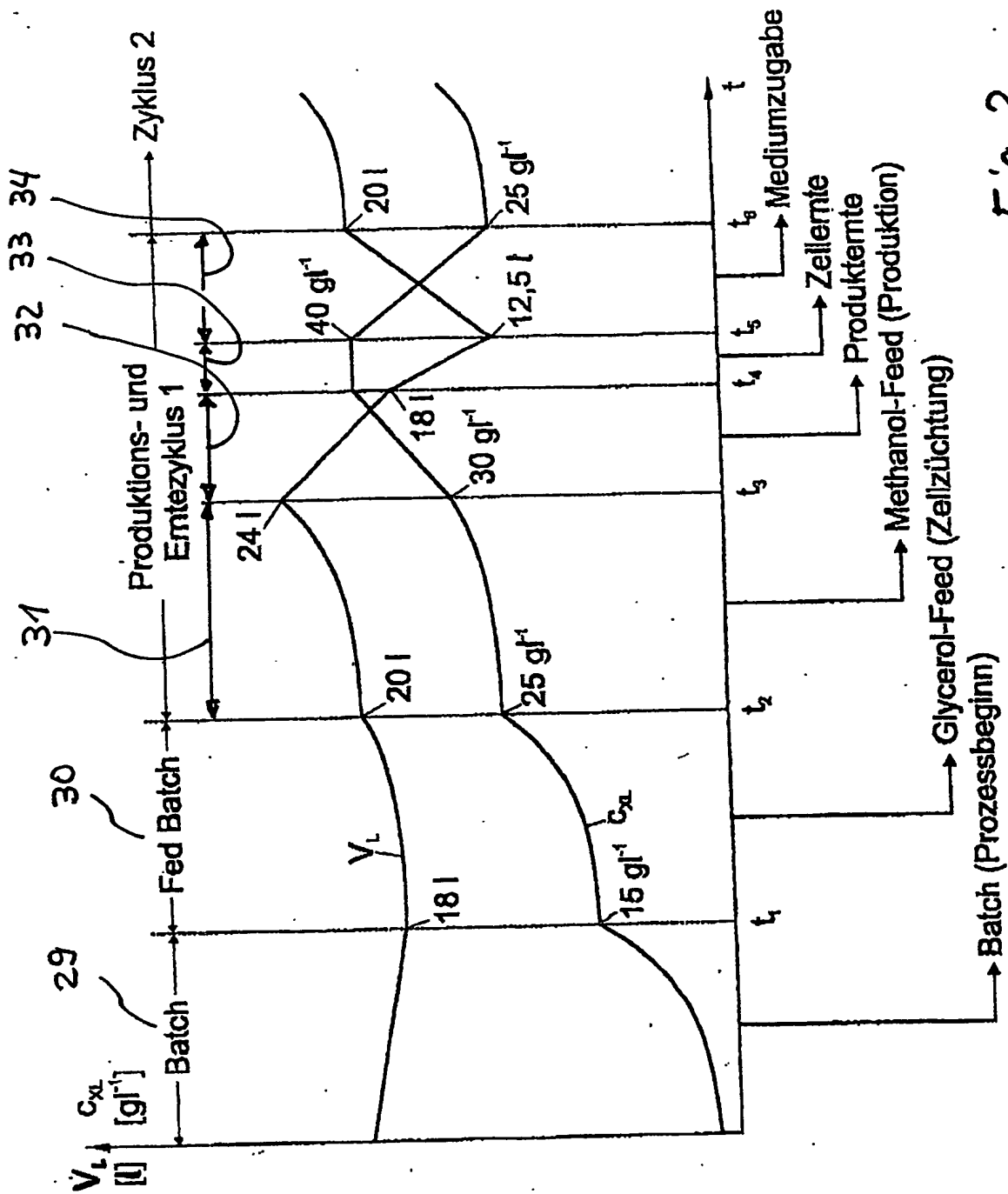


Fig. 2

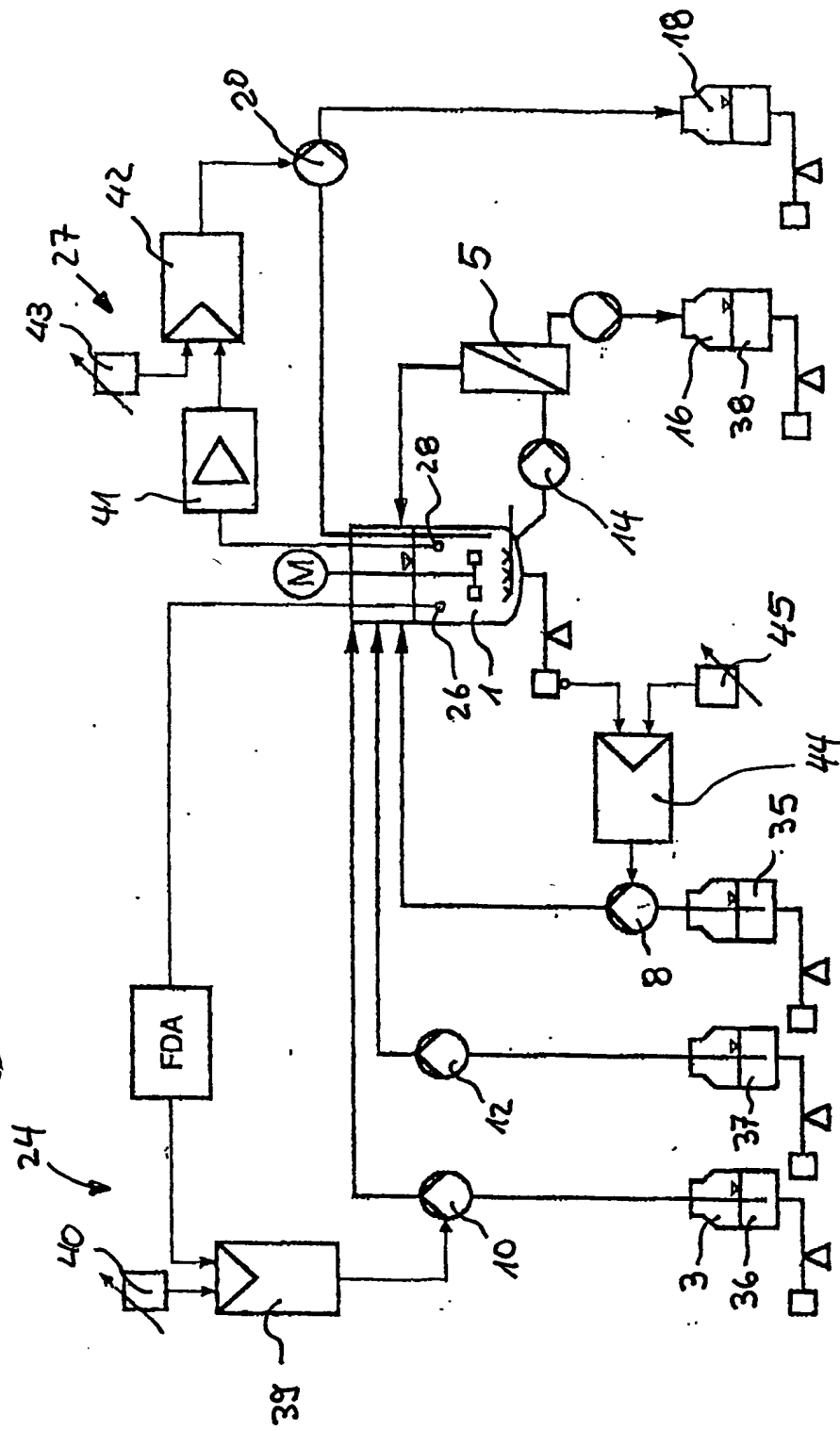


Fig. 3

Anmelder: Sartorius AG
Anwaltsakte: P-SAR 19

Zusammenfassung

Verfahren und Vorrichtung zur biotechnologischen Herstellung von Wertstoffen bei dem einem Bioreaktor ein Medium zugefüttert und einem Fermentationsprozess unterzogen wird und bei dem über eine nachgeschaltete Querstromfiltrationsanlage der Wertstoff als gefiltertes Permeat und / oder als konzentriertes Retentat geerntet wird und Rückstände dem Bioreaktor bis zur Ernte als Retentat wieder zugeführt werden, wobei neben dem Medium weitere Stoffe dem Bioreaktor kontrolliert zugefüttert werden können, wobei das konzentrierte Retentat und das Permeat kontrolliert geerntet werden können, und wobei über eine digitale Kontrolleinheit der Fermentationsprozess und die Filtration in einem integrierten System aufeinander abgestimmt geregelt werden.